

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-083977

(43)Date of publication of application : 19.03.2003

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/92  
A61K 31/4152  
A61P 1/16  
A61P 3/10  
A61P 9/10  
A61P 25/18  
A61P 35/00  
G01N 30/88  
G01N 33/50  
// C07D231/22

---

(21)Application number : 2001-276622

(71)Applicant : MITSUBISHI-TOKYO  
PHARMACEUTICALS INC

(22)Date of filing : 12.09.2001

(72)Inventor : YAMAMOTO JYUNKAN

---

(54) METHOD OF MEASURING OXIDATION STRESS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new method by which oxidation stresses can be measured accurately and quantitatively.

SOLUTION: In this method of measuring oxidation stress, a mono-unsaturated fatty acid contained in a living body is used as a marker.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's

**BEST AVAILABLE COPY**

decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-83977  
(P2003-83977A)

(43) 公開日 平成15年3月19日 (2003.3.19)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号 | F I             | テ-マコ-ト*(参考) |
|---------------------------|------|-----------------|-------------|
| G 0 1 N 33/92             |      | G 0 1 N 33/92   | Z 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 K 31/4152           |      | A 6 1 K 31/4152 | 4 C 0 8 6   |
| A 6 1 P 1/16              |      | A 6 1 P 1/16    |             |
| 3/10                      |      | 3/10            |             |
| 9/10                      |      | 9/10            |             |

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-276622(P2001-276622)

(22) 出願日 平成13年9月12日 (2001.9.12)

(71) 出願人 399027794

三菱東京製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号

(72) 発明者 山本 順寛

東京都杉並区本天沼3-34-38-107

(74) 代理人 100096219

弁理士 今村 正純 (外3名)

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 CA25 CA26 DA60

FB06

4C086 AA01 AA02 BC36 MA01 MA04

NA14 ZA15 ZA36 ZA45 ZA75

ZB26

(54) 【発明の名称】 酸化ストレスの測定方法

(57) 【要約】

【課題】 酸化ストレスを的確かつ定量的に測定するための新規な方法を提供すること。

【解決手段】 マーカーとして生体中のモノ不飽和脂肪酸を用いることを特徴とする酸化ストレスの測定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 マーカーとして生体中のモノ不飽和脂肪酸を用いることを特徴とする酸化ストレスの測定方法。

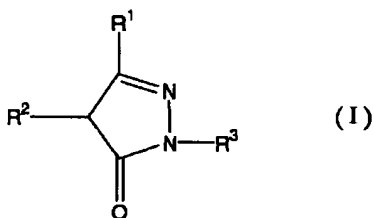
【請求項2】 モノ不飽和脂肪酸がオレイン酸（18：1）及び／又はパルミトオレイン酸（16：1）である、請求項1に記載の酸化ストレスの測定方法。

【請求項3】 モノ不飽和脂肪酸の測定を液体クロマトグラフィー法によって行う、請求項1又は2に記載の酸化ストレスの測定方法。

【請求項4】 被験者の生体中のモノ不飽和脂肪酸の含有量を測定し、その測定値より酸化ストレス疾患の病態を分析または評価することを特徴とする臨床検査方法。

【請求項5】 下記式（I）で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を投与した被験者の生体中のモノ不飽和脂肪酸の含有量を測定することを含む、当該ピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法。

【化1】



（式中、R¹は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表わし；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表わし；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基又は非置換の、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。）

【請求項6】 式（I）において、R¹が炭素数1～5のアルキル基であり、R²が水素原子であり、R³が、炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総

炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 式（I）で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩が、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン又はその薬学的に許容される塩である、請求項5又は6に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酸化ストレスの測定方法に関するものである。さらに詳細には、本発明は、マーカーとして生体中のモノ不飽和脂肪酸を用いることを特徴とする酸化ストレスの測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】何らかの原因で細胞内あるいは細胞周囲で生体内酸化防御機構にインバランスが生じると、生体膜が酸化されるが、最も酸化されやすいのは膜脂質中の高度不飽和脂肪酸である。高度不飽和脂肪酸の減少を補うために、細胞は脂肪酸不飽和酵素を活性化し、ステアリン酸（18：0）のオレイン酸（18：1）への、パルミチン酸（16：0）のパルミトオレイン酸（16：1）への変化が進行する。さらに酸化ストレスが亢進し、細胞が死に至ると、加水分解酵素が働き、遊離の脂肪酸が血流中に出てくることになるが、その遊離脂肪酸の組成は酸化ストレスがかかっていない場合に比べ、高度不飽和脂肪酸の割合が少なく、モノ不飽和脂肪酸（オレイン酸（18：1）、パルミトオレイン酸（16：1））の割合が多いことが知られている。

【0003】酸化ストレスにより誘発または進行、増悪する疾患としては、肝障害、脳血管障害（脳梗塞、くも膜下出血、脳出血、頭部外傷）、糖尿病、癌などが挙げられる。現在までの所、血漿中モノ不飽和脂肪酸が上昇する例としては、ラット肝障害モデル（四塩化炭素投与、LECラット）、脳塞栓症急性期患者、新生児などで報告がある。

【0004】従来から、障害部位での酸化障害は認識されているが、障害部位での酸化障害（例えば、脳梗塞では脳組織が酸化障害を受ける）を的確かつ定量的に実証したという報告はない。動物実験で標的臓器を摘出・抽出し、過酸化脂質を定量する方法は知られているが、組織抽出は臨床の現場で組織（例えば、肝臓や脳など）での酸化障害を評価する場合には、現実的ではない。酸化障害を的確かつ定量的に、組織を侵襲することなく血液などを標品として測定できる方法を開発する必要が依然として存在している。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、酸化ストレスを的確かつ定量的に測定するための新規な方法を提供

することを解決すべき課題とした。本発明はまた、組織を侵襲することなく血液などを標品として測定できる、新規な酸化ストレスの測定方法を提供することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、本明細書に記載した一定の構造を有するピラゾロン誘導体が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法を提供することを解決すべき課題とした。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討し、ラット脳虚血再開通モデルにおける酸化ストレスマーカー（モノ不飽和脂肪酸、即ち、オレイン酸（18：1）及びパルミトオレイン酸（16：1））の変化を測定した結果、その上昇が認められた。また、この酸化ストレスを薬物の投与により抑制できるかどうかを検討した結果、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを投与した場合に、上記の酸化ストレスマーカーの上昇が抑制されることが判明した。これらの結果は、組織（脳など）の酸化ストレス（酸化障害）を測定するためのマーカーとして、モノ不飽和脂肪酸、即ち、オレイン酸（18：1）及びパルミトオレイン酸（16：1）が有用であることを実証するものである。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

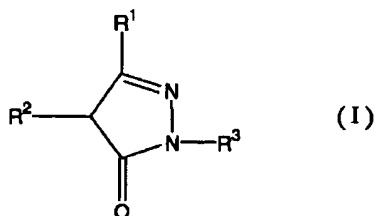
【0007】即ち、本発明によれば、マーカーとして生体中のモノ不飽和脂肪酸を用いることを特徴とする酸化ストレスの測定方法が提供される。好ましくは、モノ不飽和脂肪酸はオレイン酸（18：1）及び／又はパルミトオレイン酸（16：1）である。好ましくは、モノ不飽和脂肪酸の測定は液体クロマトグラフィー法によって行う。

【0008】本発明の別の側面によれば、被験者の生体中のモノ不飽和脂肪酸の含有量を測定し、その測定値より酸化ストレス疾患の病態を分析または評価することを特徴とする臨床検査方法が提供される。

【0009】本発明のさらに別の側面によれば、下記式（I）で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を投与した被験者の生体中のモノ不飽和脂肪酸の含有量を測定することを含む、当該ピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法が提供される。

#### 【0010】

#### 【化2】



【0011】（式中、R¹は、水素原子、アリール基、

炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表わし；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表わし；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基又は非置換の、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシ基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。）

【0012】好ましくは、式（I）において、R¹は炭素数1～5のアルキル基であり、R²は水素原子であり、R³は、炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシ基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基である。特に好ましくは、式（I）で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩は、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン又はその薬学的に許容される塩である。

#### 【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本発明においては、オレイン酸（18：1）及びパルミトオレイン酸（16：1）などのモノ不飽和脂肪酸をマーカー（指標）として、酸化ストレスの測定を行う。本発明においては、対象となる生体から血漿、血液または髄液などの生体試料を採取し、その生体試料中に存在するオレイン酸（18：1）及びパルミトオレイン酸（16：1）などのモノ不飽和脂肪酸を、公知の各種の測定手法にて測定する。

【0014】オレイン酸（18：1）及びパルミトオレイン酸（16：1）などのモノ不飽和脂肪酸の量の測定は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの液体クロマトグラフィー法で行うことが好ましい。高速液体クロマトグラフィーによるモノ不飽和脂肪酸の量の測定は常法に従って行うことができ、カラムとしては、例えば、オクタシルカラム（3μm、3.3cm×4.6mm i.d.、Supelco）

+pkb-100カラム (5 $\mu$ m, 25cm $\times$ 4.6mm i.d., Supelco) などを使用でき、移動相としては、例えば、アセトニトリル/メタノール/水=17.5/65.0/17.5(v/v/v)を用いることができる。流速は例えば、1.5ml/分とし、カラム温度は40℃に設定することができる。但し、これらは高速液体クロマトグラフィの一例を示すものにすぎず、当業者であれば好適な条件を適宜設定することができる。

【0015】本発明においては、好ましくは、総遊離脂肪酸に対するパルミトオレイン酸の割合(%16:1)、並びに総遊離脂肪酸に対するオレイン酸の割合(%18:1)を測定する。このようにして得られるオレイン酸(18:1)及びパルミトオレイン酸(16:1)などのモノ不飽和脂肪酸の量は、生体内において生成する活性酸素又はフリーラジカルの存在量を反映するものであり、従って酸化ストレスの状態を反映するものである。従って、その測定値の大小により、酸化ストレスの大小の状態を把握することができる。また、その測定値から、酸化ストレス疾患の状態を効果的に分析または評価することが可能である。

【0016】酸化ストレス疾患としては、モノ不飽和脂肪酸の上昇を伴う疾患が好ましい。酸化ストレス疾患の具体例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0017】(1)脳血管障害、脳機能低下、血管性痴呆、加齢に伴う脳血管組織病変等の諸種脳疾患；頭部外傷、脳内出血、脳動脈硬化、脳梗塞、脳塞栓、前期疾患に起因する脳浮腫等び虚血性脳血管障害；脳血管障害亜急性期及び慢性期に認められる諸種疾患、例えば血管性痴呆に代表される脳機能低下；加齢に伴う脳血管組織病変の進展によって併発される諸種脳症；脳血管障害の急性期及び慢性期に出現する意識混濁など；

【0018】(2)諸種虚血性疾患若しくはそれに基づく諸種疾患、即ち、脳梗塞、脳卒中等の脳血管障害、又はそれらに起因する脳機能低下、血管性痴呆、加齢に伴う脳血管組織病変等の諸種脳疾患、心筋梗塞、心不全等心筋虚血に基づく諸種心疾患及び諸種末梢循環障害等；

(3)末梢循環器障害、とりわけ虚血性胃粘膜障害；外

傷などによる出血性ショック、大量出血を伴う手術時、敗血症、火傷時のcurling潰瘍などのいわゆるストレス潰瘍；

【0019】(4)脾臓の機能障害に基づく血糖上昇；  
(5)各種の眼疾患、特に老化や糖尿病による白内障あるいは網膜症、更には先天性ならびに薬剤等による後天性の白内障、並びに緑内障など；

(6)日焼け、色素沈着症、皮膚ガン、老化、光線過敏症等の皮膚組織障害；

【0020】(7)植皮法や皮弁法などの皮膚移植法、筋弁や筋皮弁などの組織移植法、又は切断指肢の複合組織再接着術などにおける移植皮膚又は移植組織の壊死；

(8)移植臓器(腎臓など)の保存(移植臓器の阻血後再灌流障害など)；

(9)急性腎不全(生理的温度下において一時的に血流が低下した場合などに惹起される温阻血性急性腎不全など)；

(10)運動ニューロン疾患(筋萎縮性側索硬化症(ALS)、脊髄性筋萎縮症(SMA)、進行性球麻痺、原発性側索硬化症(PLS)、又は先天性多発性間接拘縮症(AMC)など)；

(11)肝障害；

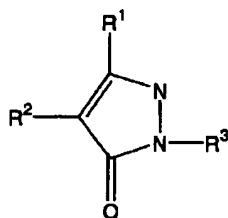
【0021】本発明では、マーカーとして用いるモノ不飽和脂肪酸は、血漿中に比較的高い割合で存在することから、通常の臨床検査において採用されるHPLC技術等を利用して、容易に実施することができる。

【0022】さらに、本発明によれば、本明細書に定義した式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を投与した被験者の生体中のモノ不飽和脂肪酸の含有量を測定することを含む、当該ピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法が提供される。

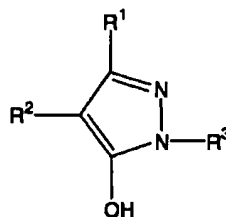
【0023】式(I)で示される化合物は、以下の式(I')又は(I'')で示される構造をもとりうる。従って、式(I')又は(I'')の構造をとる化合物も本発明の有効成分に含まれる。

【0024】

【化3】



(I')



(I'')

【0025】式(I)において、R<sup>1</sup>の定義におけるアリール基としては、フェニル基並びにメチル基、ブチル

基、メトキシ基、ブトキシ基、塩素原子及び水酸基等の置換基で置換されたフェニル基等が挙げられる。R<sup>1</sup>、

R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>の定義における炭素数1~5のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基等が挙げられる。

【0026】R<sup>1</sup>の定義における総炭素数3~6のアルコキシカルボニルアルキル基としては、メトキシカルボニルメチル基、エトキシカルボニルメチル基、プロボキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基等が挙げられる。

【0027】R<sup>2</sup>の定義におけるアリールオキシ基としては、フェノキシ基、p-メチルフェノキシ基、p-メトキシフェノキシ基、p-クロロフェノキシ基、p-ヒドロキシフェノキシ基等が挙げられ、アリールメルカプト基としては、フェニルメルカプト基、p-メチルフェニルメルカプト基、p-メトキシフェニルメルカプト基、p-クロロフェニルメルカプト基、p-ヒドロキシフェニルメルカプト基等が挙げられる。

【0028】R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>の定義における炭素数1~3のヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基等が挙げられる。R<sup>3</sup>の定義における炭素数5~7のシクロアルキル基としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基等が挙げられる。

【0029】R<sup>3</sup>の定義において、フェニル基の置換基における炭素数1~5のアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、プロボキシ基、イソプロボキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基等が挙げられ、総炭素数2~5のアルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロボキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基等が挙げられ、炭素数1~3のアルキルメルカプト基としては、メチルメルカプト基、エチルメルカプト基、プロピルメルカプト基等が挙げられ、炭素数1~4のアルキルアミノ基としては、メチルアミノ基、エチルアミノ基、プロピルアミノ基、ブチルアミノ基等が挙げられ、総炭素数2~8のジアルキルアミノ基としては、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基、ジブチルアミノ基等が挙げられる。

【0030】本発明で用いる式(I)の化合物の具体例としては、例えば、以下に示す化合物が挙げられる。

3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン  
3-メチル-1-(2-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(3-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン  
3-メチル-1-(4-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(3,4-ジメチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン  
1-(4-エチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾ

リン-5-オン

3-メチル-1-(4-プロピルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ブチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3-トリフルオロメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-トリフルオロメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

【0031】1-(2-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3,4-ジメトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-エトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(4-プロボキシフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ブトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(2-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3,4-ジクロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

【0032】1-(4-プロモフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-フルオロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3-クロロ-4-メチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3-メチルメルカプトフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-メチルメルカプトフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

4-(3-メチル-5-オキソ-2-ピラゾリン-1-イル)安息香酸

1-(4-エトキシカルボニルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ニトロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

3-エチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン  
1-フェニル-3-プロピル-2-ピラゾリン-5-オン

【0033】1-(3-ジフェニル-2-ピラゾリン-5-オン

3-フェニル-1-(p-トリル)-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-クロロフェニル)-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

3,4-ジメチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

4-イソブチル-3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

4-(2-ヒドロキシエチル)-3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-4-フェノキシ-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-4-フェニルメルカプト-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

【0034】3,3',4,5,6,7-ヘキサヒドロ-2-フェニル-2H-インダゾール-3-オン

3-(エトキシカルボニルメチル)-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1,3-ジメチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-エチル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-ブチル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(2-ヒドロキエチル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-シクロヘキシル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-ベンジル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

【0035】1-( $\alpha$ -ナフチル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-メチル-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(4-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ブチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ブトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

【0036】1-(2-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3,4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ヒドロキシメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

【0037】1-(4-アミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-メチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-エチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ブチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ジメチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(アセトアミドフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-シアノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

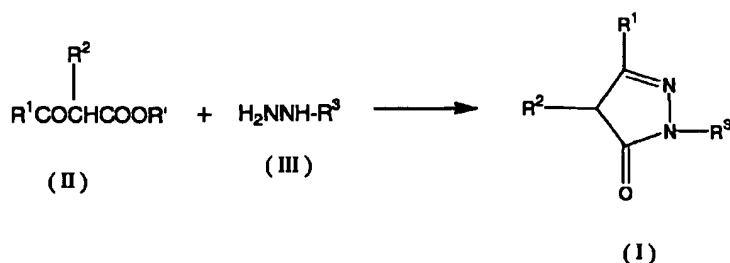
【0038】本発明で用いる式(I)の化合物の塩のうち、薬学的に許容される塩としては、塩酸、硫酸、臭化水素塩、リン酸等の鉱酸との塩；メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、酢酸、グリコール酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、アスコルビン酸、クエン酸、サリチル酸、ニコチン酸、酒石酸等の有機酸との塩；ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩；マグネシウム、カルシウム等のアルカリ金属土類との塩；アンモニア、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、N,N-ビス(ヒドロキシエチル)ピペラジン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、エタノールアミン、N-メチルグルカミン、L-グルカミン等のアミンとの塩が挙げられる。

【0039】本発明に用いる化合物は、合目的な任意の方法で合成することができるが、好ましい方法の1例を次に示す。

【0040】

【化4】



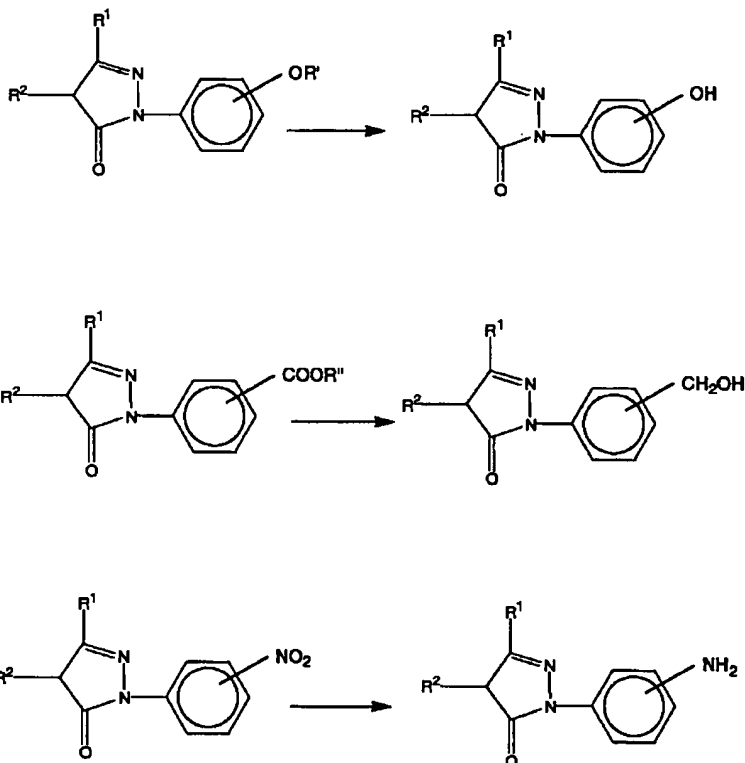


【0041】(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は前記と同義であり、 $\text{R}^1$ は炭素数1〜5のアルキル基を表す。) 即ち、式(II)で示される $\beta$ -ケト酸誘導体と式(I)で示されるヒドラジン誘導体を、例えばメタノール、エタノール等のアルコール類若しくはベンゼン、トルエン等の芳香族類のような溶媒の存在下又は無溶媒で、必要に応じて、炭酸カリウム、ナトリウムエトキシド、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、酢酸ナトリウ

ム等の塩基、塩酸、硫酸、臭化水素酸等の鉱酸、酢酸、パラトルエンスルホン酸等の有機酸等の触媒の存在下、10〜200℃の温度で反応させることにより、式(I)の化合物を得ることができる。また、 $\text{R}^3$ のアリール基の置換基によっては次に示すようにして目的物を合成することができる。

【0042】

【化5】



【0043】(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は前記と同義であり、 $\text{R}''$ は水素原子、炭素数1〜5のアルキル基又は総炭素数2〜6のアルコキシカルボニル基を表す。) 該置換基が水酸基である目的物は、例えば適当なアルコキシ基を臭化水素酸又はルイス酸で分解することにより得ることができる。該置換基がヒドロキシメチル基である目的物は、例えばカルボン酸又はその誘導体を適当な還元剤、例えば水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素ナトリウム、ジボランで還元することにより得ることができる。該置換基がアミノ基である目的物は、例えば、ニトロ基を適当な条件、例えば水素-Pd/C、塩酸-塩化第二スズで還元することにより得ることができ

る。

【0044】なお、本発明で用いる式(I)の化合物は公知化合物であり、例えば、特公平5-31523号公報、特公平5-35128号公報などに記載されている。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0045】

【実施例】(方法)

1. 使用動物

7週齢のCrj:CD(SD)雄性ラット(入荷時体重:197.8〜228.8g、日本チャールズ・リバー株式会社)を50匹購入

し、5日間以上の検疫馴化期間に一般状態の観察及び体重測定を行い、異常がなく順調な体重推移を示すことを確認した後、8週齢で試験に供した。すべての動物は、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数13回/時及び照明12時間（午前7時～午後7時）に設定した飼育室内で飼育した。

#### 【0046】2. 試験群の構成

体重差による脳梗塞形成のバラツキを防ぐため、手術日の体重を元に層別連続無作為化法で群分けし、生理食塩液投与（対照群及び偽手術（sham ope）群）、被験物質投与（単回投与群及び反復投与群）の計4群を設定した。

#### 【0047】3. MCA閉塞再開通モデルの作製

ラットを3%イソフルラン吸入にて麻酔導入後、仰臥位に固定し、2%イソフルラン吸入にて麻酔を維持した。フリームービングの状態下で持続注入を行うためにカテーテルを大腿静脈内に留置した。頸部正中皮膚切開を行い、右側総頸動脈、外頸動脈及び内頸動脈を露出し、総頸動脈及び外頸動脈を縫合糸（5号）で結紮した。予めシリコンコーティング（キサントプレシ、バイエル薬品）をし19mmの長さで切断した4号のナイロン糸（栓子）を、外頸動脈と内頸動脈の分岐部より挿入し、MCAを閉塞した。MCA閉塞2時間後に栓子を抜き、MCAの血流を再開通させた。MCA閉塞30分後に神経症状（前肢の屈曲）を観察し、前肢の屈曲が確認できない動物は試験から除外した。偽手術群については、本法に準拠して右側総頸動脈及び外頸動脈の結紮まで実施した。手術中の体温調節を行うために体温計用プローブ（PHYSITEMP INSTRUMENTS Inc. BAT-12）を直腸内に挿入しておき、手術前後の体温を記録した。体温低下が見られた場合、白熱灯を用いて体温を $37^\circ\text{C}$ 付近に維持した。

#### 【0048】4. 薬物の投与

MCA閉塞再開通直後3mg/kgの3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを1.0mL/body/hの容量で30分間の持続注入（1回目投与）を行い、6時間後同容量で再度30分間の持続注入（2回目投与）を行った。手術翌日より、午前10時及び午後16時にインフュージョンポンプ（KD SCIENTIFIC, 10連 infusion pump 230）を用いて3mg/kgの3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを1.0mL/body/hの容量で1日2回30分間の持続注入を連続13日間行った。投与液の濃度は最新の体重をもとに算出した。なお、単回投与群は、手術日の1回目のみ3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを投与し、2回目以降は同容量の生理食塩液を投与した。対照群及び偽手術群には生理食塩液を同容量で投与した。

#### 【0049】5. 採血

MCA閉塞前、閉塞再開通後、1, 2, 3, 5, 7および10日目の1回目の投与開始前及び14日目の午前10時よりヘパリン処理した1 mLシリンジを用いて鎖骨下静脈から血

液を約0.3mL採取し、3000rpm、10分間遠心して血漿を分離した。血漿は4本のマイクロチューブに25 $\mu\text{L}$ ずつ分注し、液体窒素で凍結させた後、送付時まで約 $-80^\circ\text{C}$ にて凍結保存した。

#### 【0050】6. 遊離脂肪酸の分離定量

12.5 $\mu\text{M}$ のマルガリン酸（13:0、内部標準）を含む200 $\mu\text{L}$ のメタノールを、50 $\mu\text{L}$ の血漿に加えよく混和した後、遠心分離した（12,000rpm、3分）。上清50 $\mu\text{L}$ の溶媒を窒素気流下で除去後、2mg/mLのモノダンシルカダベリンのジメチルホルムアミド溶液50 $\mu\text{L}$ と1 $\mu\text{L}$ のシアノリン酸ジエチルを加え、20分間暗所で反応させて、遊離脂肪酸を蛍光誘導化した。

【0051】高速液体クロマトグラフィーに反応液5 $\mu\text{L}$ を注入し、総脂肪酸量と脂肪酸組成を調べた。高速液体クロマトグラフィーの条件は以下のとおりである。

カラム：オクタシルカラム（3 $\mu\text{m}$ 、3.3cm $\times$ 4.6mm i.d.、Supelco）+pkb-100カラム（5 $\mu\text{m}$ 、25cm $\times$ 4.6mm i.d.、Supelco）

移動相：アセトニトリル/メタノール/水=17.5/65.0/17.5(v/v/v)

流速：1.5mL /分

カラム温度： $40^\circ\text{C}$

蛍光検出器励起波長：320nm

蛍光検出器蛍光波長：520nm

【0052】（結果・考察）結果を図1及び図2に示す。図1は、血漿中のパルミトオレイン酸（16:1）の割合の経時的変化を示すグラフである。総遊離脂肪酸に対するパルミトオレイン酸（16:1）の割合を%16:1と定義する。図1において、第0日目における%16:1の値を基準として、変化の百分率（%）をグラフの縦軸に示し、日数をグラフの横軸に示す。

【0053】図2は、血漿中のオレイン酸（18:1）の割合の経時的変化を示すグラフである。総遊離脂肪酸に対するオレイン酸の割合を%18:1と定義する。第0日目における%18:1の値を基準として、変化の百分率（%）をグラフの縦軸に示し、日数をグラフの横軸に示す。

【0054】図1および図2において、Controlは対照群を示し、Shamは偽手術群を示し、MCI 1 dayは単回投与群を示し、MCI 14 dayは14日間投与群を示す。

【0055】偽手術群（Sham）のラットでは、パルミトオレイン酸（16:1）及びオレイン酸（18:1）の割合に大きな変動は見られなかった。しかし、対照群（Control）のラットでは、MCA閉塞-再開通後1～5日後までパルミトオレイン酸（16:1）及びオレイン酸（18:1）の割合が有意に上昇し、この間の酸化ストレス亢進が示唆された。一方、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを投与した群では、パルミトオレイン酸（16:1）及びオレイ

ン酸(18:1)の割合は、対照群と比較して有意に抑制された。

【0056】上記の結果は、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンが脳虚血-再開通後に増加するラジカルを有効に消去し、脂質過酸化反応を抑制することにより脳を保護することを示唆する。

【0057】

【発明の効果】本発明により、酸化ストレスを的確かつ定量的に測定するための新規な方法を提供される。本発明の方法は、組織を侵襲することなく血液などを標品として測定できる。さらに、本発明によれば、血漿中のモノ

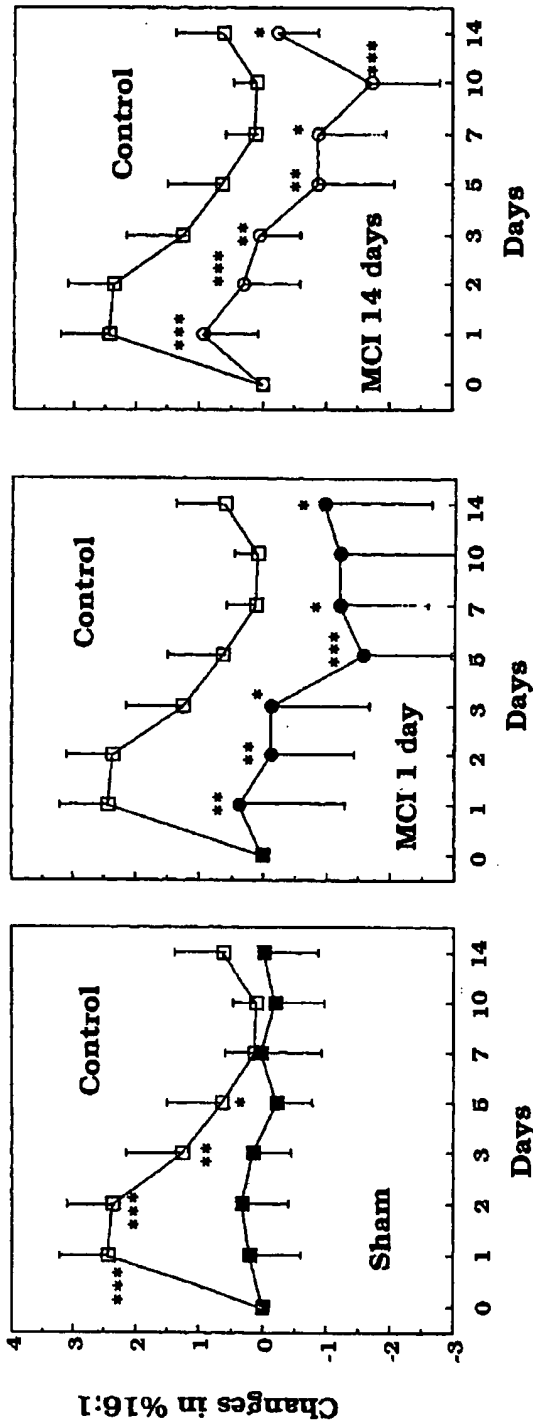
ノ不飽和脂肪酸の含有量をマーカーとすることにより、本明細書に記載した一定の構造を有するピラズロン誘導体が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法が提供される。本発明の方法によれば、当該ピラズロン誘導体の薬剤としての有効性を的確かつ簡単に評価することができる。

【図面の簡単な説明】

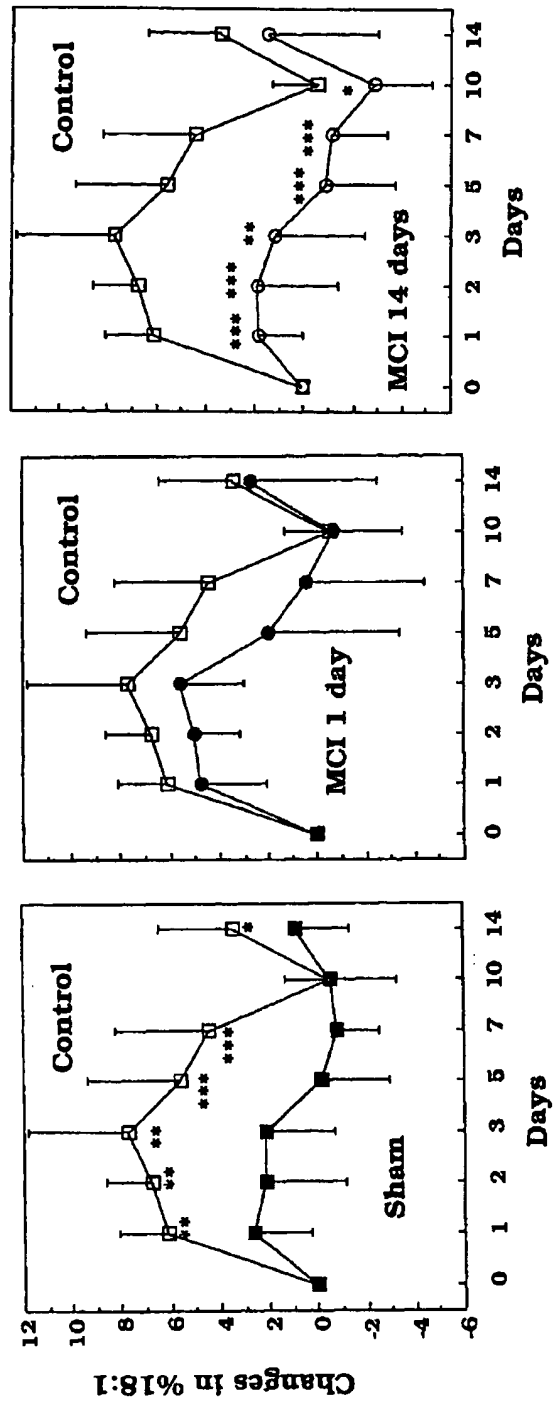
【図1】図1は、血漿中のパルミトオレイン酸(16:1)の割合の経時的変化を示すグラフである。

【図2】図2は、血漿中のオレイン酸(18:1)の割合の経時的変化を示すグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

| (51)Int. Cl. <sup>7</sup> | 識別記号 | F I            | テ-マ-ド (参考) |
|---------------------------|------|----------------|------------|
| A 6 1 P 25/18             |      | A 6 1 P 25/18  |            |
| 35/00                     |      | 35/00          |            |
| G 0 1 N 30/88             |      | G 0 1 N 30/88  | C          |
| 33/50                     |      | 33/50          | U          |
| // C 0 7 D 231/22         |      | C 0 7 D 231/22 | A          |